

基因芯片技术筛选血管瘤发生相关基因

张莉¹, 张成书¹, 王君¹, 李旭文¹, 葛树星¹, 李光早¹, 林晓曦²

[摘要]目的:利用基因芯片技术寻找血管瘤与正常组织之间差异表达的基因,初步探索血管瘤的发生机制。方法:将14 112条cDNA用点样仪点在特制玻片上制备成表达谱芯片,将来自同一患儿的血管瘤组织和正常组织的mRNA分别逆转录为cDNA,标记Cy3和Cy5两种荧光,制备成cDNA探针,与表达谱芯片杂交,通过计算机扫描、数据处理筛选出差异表达的基因。结果:血管瘤组织与正常组织共有249个差异表达基因,其中下调基因122个,上调基因127个。上调基因主要与细胞增生、血管形成、免疫细胞的黏附、细胞周期相关蛋白等有关;下调基因主要与细胞凋亡、肿瘤抑制等有关。结论:细胞增生相关基因的上调与凋亡相关基因的下调,导致细胞增生与凋亡失调,可能是引起血管瘤发病的原因。

[关键词] 血管瘤;基因芯片;发病机制

[中国图书资料分类法分类号] R 732.2 **[文献标识码]** A

Identification of differentially expressed genes in proliferating hemangiomas by cDNA microarray analysis of gene expression profiles

ZHANG Li¹, ZHANG Cheng-shu¹, WANG Jun¹, LI Xu-wen¹, GE Shu-xing¹, LI Guang-zao¹, LIN Xiao-xi²

(1. Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai 9th Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the differentially expressed genes of proliferating hemangiomas and normal tissue by cDNA microarray analysis of gene expression profiles and to identify the key disease related genes. **Methods:** Samples were processed from total RNA and purified to mRNA, which was reverse transcribed and hybridized onto Biodoor Genechip expression microarrays. Gene expression analysis were performed to determine the differences between the proliferating hemangiomas and the normal tissue. **Results:** In proliferating hemangioma, 122 genes were up-regulated and 127 genes were down-regulated. Those over-expressed gene were mainly related to cell proliferation, angiogenesis, and immune cell adhesion, cell cycle-related protein, while the less-expressed genes were mainly related to cell apoptosis and tumor suppression. **Conclusions:** Over-expression of genes related to cell proliferation and less-expression of cell apoptosis related genes lead to imbalance between cell proliferation and apoptosis, which probably lead to the occurrence of hemangiomas.

[Key words] hemangioma; gene chip; pathogenesis

血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤,发病率约1%,其发生机制与血管形成有关,但确切机制尚不

明确。目前对血管瘤发病机制的研究方法多采用免疫组化、原位杂交、RT-PCR、DD-RT-PCR等,研究者选择几个与血管形成有关的因子进行研究,虽然得出的结果证实了血管瘤的发生、发展与血管发生有关^[1],但不能从整体上找出血管瘤发生、发展的途径和其分子机制,得出的结果也犹如“盲人摸象”,很难找出其发病机制的根本环节。本研究利用基因芯片技术大规模、高通量地对增生期血管瘤组织与其周围正常组织差异表达基因进行整体研究,探讨血管瘤的发生机制。

[收稿日期] 2008-07-26

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2005kj282)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 整形外科,安徽 蚌埠 233004; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 整复外科,上海 200011

[作者简介] 张莉(1965-),女,博士,研究生导师,副主任医师,副教授。

[4] Gu J, Fang B. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(4 Suppl 1):64-70.

[5] Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(10):2 034-2 043.

[6] Zhou C, Boggess JF, Bae-Jump V, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by arsenic trioxide (As₂O₃) in endometrial carcinoma cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 105(1): 218-222.

[7] Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on

telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells *in vitro*[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(11):1 811-1 817.

[8] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4):826-830.

[9] 黄君健, 李杰之, 林坚, 等. 人端粒酶催化亚基hTERT基因启动子的克隆[J]. *生物技术通讯*, 1999, 10(3):167-170.

1 材料与方 法

1.1 材料 研究对象为我科临床明确诊断的增生期血管瘤患儿,例 1,男性,7 个月,右胸壁皮下血管瘤;例 2,男性,2 个月,左前臂皮肤血管瘤。瘤体手术切除后,剪除其中的脂肪结缔组织,取其结节状增生的瘤体组织,同时切取与瘤体 1 cm 处的正常组织为对照,将标本快速放入 RNase-free 的冷冻管中, -80 °C 低温保存,整个过程在 5 min 内完成。留取小部分组织送病理检测,行 HE 染色。

1.2 芯片的制备 选用的芯片类型为 BiostarH-140s(上海博星生物有限公司提供),芯片含有 14 112 个靶基因 cDNA,所包含的基因类型有:(1)原癌基因和抑癌基因;(2)离子通道和运输蛋白;(3)细胞周期蛋白类;(4)外压反应蛋白;(5)细胞骨架和运动;(6)细胞凋亡相关蛋白;(7)DNA 合成和修复、重组蛋白;(8)DNA 结合、转录和转录因子;(9)细胞受体;(10)免疫相关;(11)细胞信号和传递蛋白;(12)代谢;(13)蛋白翻译合成;(14)发育相关;(15)其它。

1.3 探针的制备 将液氮冻存的组织标本用 Biostar 公司的 Trizol 试剂一步法加以改进抽提总 RNA,用 Oligotex mRNA Midi Kit (Biostar 公司)纯化 RNA。参照 Schena 等^[2]的方法反转录标记 cDNA 探针并纯化, Cy3-dCTP 标记增生期血管瘤组织 RNA,用 Cy5-dCTP 标记正常组织 RNA。

1.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针分别在 95 °C 水浴中变性 5 min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于 60 °C 杂交 15 ~ 17 h。然后揭开盖玻片,分别用 2 × SSC + 0.2% SDS、0.1% × SSC + 0.2% SDS、0.1% × SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

1.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 4000 扫描芯片,用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值,用 Spotfire8.0 软件进行均一化分析,若 Cy3/Cy5 比值 > 2 或 < 0.5,或者 Cy3、Cy5 其中之一的信号值 > 800,即判定为差异基因。

2 结果

2.1 病理结果 2 例标本均见内皮细胞增生活跃,细胞肥大,核深染,部分有核分裂相,毛细血管管腔数量少,间质组织少(见图 1),符合“增生期血管瘤”的临床诊断。

2.2 基因芯片扫描结果 图 2 为双色荧光标记叠加图,对于某一点的两重叠加荧光信号,如果 Cy3 信号较强,该点多显绿色(下调趋势);如果 Cy5 信号

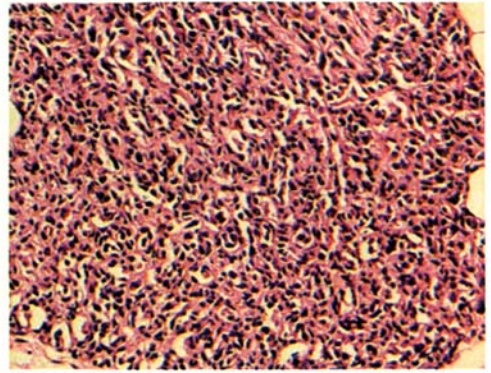


图 1 增生期血管瘤,大量密集内皮细胞及微血管形成(x400)

较强,该点多显红色(上调趋势);如果强度相似,即显黄色。图 3 为杂交信号强度散点图,每个点的 X 轴为 Cy3 杂交信号相对强度,Y 轴为 Cy5 杂交信号相对强度,每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号;数据点若为红色,则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 ~ 2.0 之间,基本属非差异表达;数据点若为黄色,则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 ~ 2.0 之外,该点很可能属于表达差异。

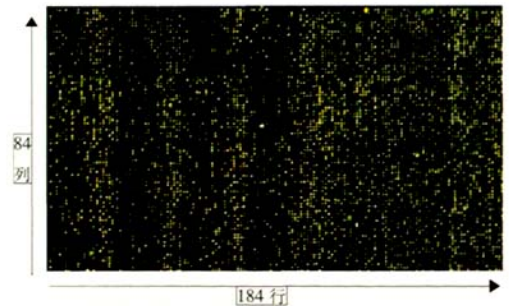


图 2 双色荧光标记叠加图

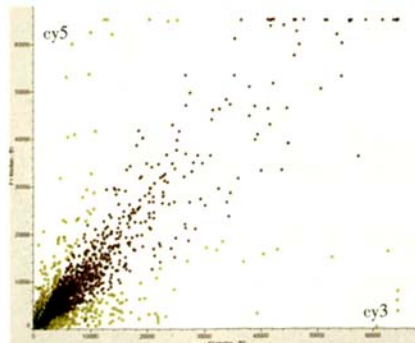


图 3 杂交信号强度散点图

2.3 增生期血管瘤与正常组织差异表达的基因 通过上述数据分析与统计,总共获得有明显差异表达的基因 249 个,其中 122 个下调,127 个上调。下

调的基因主要与细胞凋亡、肿瘤抑制等有关(见表1);上调的基因主要与细胞增生、血管形成、细胞周期相关蛋白、免疫细胞的黏附等有关(见表2)。

3 讨论

基因芯片是新近兴起的一项前沿生物学技术,其特点是能大规模、高流量和全自动地研究成千上万个基因的表达情况,利用基因芯片技术可方便地对疾病的相关基因进行筛选,从而准确地地在基因分

子水平上对疾病的病因和发病机制进行研究。2003年张莉等^[1]用含有4 096条基因的通用芯片研究同一血管瘤增生期和消退期差异基因的表达,以寻找启动血管瘤消退的机制,发现与细胞凋亡相关基因在增生期低表达而在消退期高表达,从而认为凋亡是血管瘤消退的关键因素。本研究利用基因芯片技术探讨增生期血管瘤组织与正常组织差异表达的基因,可以大规模、高通量地筛选出与血管瘤增生有关的基因,有助于全面地、从分子水平阐明血管瘤的发

表1 增生期血管瘤下调基因

基因登录号	基因名称	Ratio 1	Ratio 2
BC042537	Homo sapiens cathepsin E, mRNA, complete cds	0.176	0.122
NM_001920	Homo sapiens decorin (DCN), mRNA	0.169	0.141
BC043599	Homo sapiens cell death-inducing DFFA-like effector c, complete cds	0.101	0.202
AB209394	Homo sapiens mRNA for tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 precursor variant protein	0.391	0.226
NM_000237	Homo sapiens lipoprotein lipase (LPL), mRNA	0.107	0.240
NM_001920	Homo sapiens decorin (DCN), transcript variant A1, mRNA	0.294	0.278
NM_005063	Homo sapiens stearyl-CoA desaturase, mRNA	0.050	0.298
BC029050	Homo sapiens arginase, type II, mRNA, complete cds	0.324	0.336
AY203947	Homo sapiens LP6728 mRNA, complete cds	0.338	0.385
NM_181435	Homo sapiens CIq and tumor necrosis factor related protein 3, transcript variant 2, mRNA	0.391	0.397
NM_002840	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type F, transcript variant 1, mRNA	0.333	0.404
NM_203339	Homo sapiens clusterin, transcript variant 2, mRNA	0.348	0.417
NM_024408	Homo sapiens Notch homolog 2, mRNA	0.439	0.434
NM_006472	Homo sapiens thioredoxin interacting protein, mRNA	0.455	0.446
AB209493	Homo sapiens mRNA for death-associated protein 6 variant protein	0.459	0.476
NM_006482	Homo sapiens dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2, transcript variant 2, mRNA	0.455	0.477

注: Ratio 1、Ratio 2 分别为病例1、2 筛选数据

表2 增生期血管瘤上调基因

基因登录号	基因名称	Ratio 1	Ratio 2
NM_152306	Homo sapiens ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 2, transcript variant 1, mRNA	2.128	2.137
NM_032777	Homo sapiens G protein-coupled receptor 124, mRNA	2.205	2.161
NM_000899	Homo sapiens KIT ligand (KITLG), transcript variant b, mRNA	2.325	2.188
NM_001718	Homo sapiens bone morphogenetic protein 6, mRNA	2.347	2.285
NM_002473	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, mRNA	3.283	2.312
NM_021219	Homo sapiens junctional adhesion molecule 2 (JAM2), mRNA	4.539	2.321
NM_020808	Homo sapiens signal-induced proliferation-associated 1 like 2, mRNA	4.230	2.434
NM_001530	Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A), transcript variant 1, mRNA	2.460	2.451
NM_005524	Homo sapiens hairy and enhancer of split 1, mRNA	2.069	2.465
NM_016081	Homo sapiens palladin (KIAA0992), mRNA	3.398	2.500
M12783	Human c-sis/platelet-derived growth factor 2 mRNA, complete cds	5.699	2.528
NM_012338	Homo sapiens tetraspanin 12, mRNA	3.352	2.969
NM_021219	Homo sapiens junctional adhesion molecule 2 (JAM2), mRNA	4.539	3.023
BC051822	Homo sapiens platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen), mRNA, complete cds	6.340	3.255
NM_001430	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1, mRNA	4.512	3.908
NM_032801	Homo sapiens junctional adhesion molecule 3 (JAM3), mRNA	5.793	3.975
NM_003998	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105) (NFKB1), mRNA	4.328	5.603
NM_003617	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 5 (RGS5), mRNA	8.527	9.512
NM_001011546	Homo sapiens destrin (actin depolymerizing factor) (DSTN), transcript variant 2, mRNA	326.305	242.975

注: Ratio 1、Ratio 2 分别为病例1、2 筛选数据

生机制。

我们通过 2 例标本、14 112 个人类基因的表达谱芯片,以增生期血管瘤组织为实验组,与其对应的正常组织为对照组,筛选出 249 个差异表达的基因,经 Pubmed 网站查询分析,发现下调基因中有 16 个基因分别与凋亡相关基因、抑癌基因等相关,例如:(1) Homo sapiens cathepsin E transcript variant 1 mRNA,其编码产物组织蛋白酶 E 在 TRAIL 依赖的细胞凋亡路径中起重要的作用^[3];(2) Homo sapiens decorin (DCN), transcript variant A1, mRNA,其编码产物核心蛋白多糖就通过 caspase-3 路径参与细胞的凋亡^[4];(3) Homo sapiens mRNA for tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 precursor variant protein,其编码产物为肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,参与 TNF 信号的转导,启动细胞死亡信号,诱发细胞凋亡;(4) Homo sapiens LP6728 mRNA,其编码产物可抑制肿瘤细胞的生长^[5](见表 1)。上调基因中有 19 个基因分别与细胞生长因子、细胞周期蛋白、血管形成相关,例如:(1) Homo sapiens bone morphogenetic protein 6 (BMP6), mRNA,其编码产物是骨形态发生蛋白 6(BMP6),其属于转化生长因子(TGF)超家族成员,参与细胞的增殖分化相关;(2) Homo sapiens ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 2 (URF2), transcript variant A1, mRNA,其编码产物是一种核蛋白,参与细胞周期的调节,对肿瘤的形成有重要的作用^[6];(3) Homo sapiens G protein-coupled receptor 124 (GPR124), mRNA,其编码产物是 G-蛋白耦联受体 124,与血管形成密切相关^[7];另外,在上调基因中还发现了一些与免疫细胞黏附和炎症反应相关的基因,如 JAM2、JAM3、SCF 的编码基因,其产物参与了 T 淋巴细胞、NK 细胞、树突状细胞、肥大细胞的黏附聚集和增生^[8,9],而这些免疫细胞所诱发的肿瘤免疫反应,可能是血管瘤内皮细胞凋亡的始动因素(见表 2)。

血管瘤的自发增生与消退是血管瘤内皮细胞增生与凋亡的外在表现,两者既受细胞外信号的调控,又受细胞内信号转导级联反应的调控,共同精细地调节着内皮细胞的增生与凋亡。本研究发现增生期血管瘤内皮细胞凋亡相关基因低表达,而与细胞增生和血管形成相关的基因高表达,这些因素促成了血管瘤内皮细胞的快速增生。血管瘤自行消退的原因一直是研究的热点,虽然细胞的凋亡参与了血管瘤的消退,但是影响血管瘤内皮细胞凋亡的因素又是一个谜。陈达等^[10,11]研究发现血管瘤演变的不

同时期均有不同程度免疫细胞的浸润,提示了机体的肿瘤免疫反应在血管瘤消退中的作用。本研究更是在基因分子水平发现了免疫细胞在血管瘤组织中浸润的原因,由于血管瘤内皮细胞免疫细胞黏附分子的表达,血管瘤的增生就必然伴随着肿瘤杀伤性细胞如自然杀伤细胞、T 细胞等的浸润,而这些细胞达到一定的数量,其导致凋亡的作用大于内皮细胞增生的作用时就发生了血管瘤的消退。进一步的研究免疫细胞在血管瘤中的数量及功能的变化,可能会开辟血管瘤发病机制研究的新思路,也可能为用免疫学手段治疗血管瘤提供理论依据和指导。

[参 考 文 献]

- [1] 张 莉,王 炜,祁佐良,等. 用基因芯片研究同一血管瘤增生和消退期差异表达基因[J]. 中华整形外科杂志,2003,19(6):452-455.
- [2] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5 235):467-470.
- [3] Kawakubo T, Okamoto K, Iwata J, et al. Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22):10 869-10 878.
- [4] Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, et al. Decorin protein core inhibits *in vivo* cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36):26 408-26 418.
- [5] Kota RS, Ramana CV, Tenorio FA, et al. Differential effects of lipoprotein lipase on tumor necrosis factor- α and interferon- γ -mediated gene expression in human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(35):31 076-31 084.
- [6] Mori T, Li Y, Hata H, et al. Nlrf, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(3):530-536.
- [7] Vallon M, Essler M. Proteolytically processed soluble tumor endothelial marker (TEM) 5 mediates endothelial cell survival during angiogenesis by linking integrin α (v) β 3 to glycosaminoglycans [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(45):34 179-34 188.
- [8] Liang TW, Chiu HH, Gurney A, et al. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3 [J]. *J Immunol*, 2002, 168(4):1 618-1 626.
- [9] Koyama M, Otsuka H, Kusumi T, et al. Stem cell factor production from cultured nasal epithelial cells-effect on SCF production by drugs [J]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, 2002, 105(2):166-173.
- [10] 陈 光,贺占国,王 琪,等. 毛细血管瘤组织中免疫细胞的分布变化及其意义 [J]. 口腔医学, 2000, 20(1):14-15.
- [11] 袁斯明,姜会庆,欧阳天祥,等. 免疫细胞在婴幼儿血管瘤组织中的分布及其变化 [J]. 医学研究生学报, 2007, 20(7):720-722.